

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ANTIPROTOZOÁLNÍ AKTIVITA ALKALOIDŮ II.

Antiprotozoal activity of alkaloids II.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2015

Radka Kvapilová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za pomoc při zpracovávání této diplomové práce, za její čas, vedení a rady. Dále děkuji své rodině, která mě podporovala během celého studia.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV 260 184.

PROHLÁŠENÍ:

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2015

.....

Obsah

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1. Prvoci	9
3.1.1. Stavba buňky.....	9
3.1.2. Reprodukce	10
3.1.3. Výživa	10
3.1.4. Rezistence	11
3.2. Alkaloidy.....	11
3.2.1. Charakteristika	12
3.2.2. Rozdělení	12
3.2.3. Použití	13
3.2.4. Výskyt vybraných alkaloidů	14
3.3. Testované látky	18
3.3.1. Kanadin	18
3.3.2. Skulerin	19
3.3.3. Tetrahydropalmitin	20
3.3.4. Stylopin	21
3.4. Testovací organismus Tetrahymena thermophila	22
3.4.1. Zařazení.....	22
3.4.2. Charakteristika	24
3.4.3. Rozmnožování.....	25
4. Experimentální část.....	26
4.1. Metoda	26
4.2. Chemikálie, přístroje, pomůcky	27
4.2.1. Užitá chemikálie.....	27
4.2.2. Užitá přístroje.....	28
4.2.3. Užitá pomůcky	29
4.3. Vyhotovení testu	29
4.3.1. Příprava	29

4.3.2. Vyhodnocení	31
5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....	33
5.1. Kanadin	34
5.2. Skulerin	35
5.3. Tetrahydropalmatin	36
5.4. Stylopin	37
6. Diskuse.....	39
7. ZÁVĚR.....	44
8. POUŽITÁ LETERATURA.....	45
Abstrakt.....	50
Abstract.....	51

1. ÚVOD

Prvoci jsou jednobuněční organismy, žijící po celém světě skoro v každém prostředí. Většina druhů je volně žijících. Všechna vyšší zvířata jsou ale infikována jedním nebo více skupinami prvoků. Infekce se pohybují od asymptomatických až po infekce ohrožující životaschopnost, v závislosti na druhu či kmenu parazita a odolnosti hostitele. (Baron, 1996)

Fosilní záznam v podobě mušlí sedimentárních hornin ukazuje, že zde prvoci byli již v dávných dobách. Anton van Leeuwenhoek byl první člověk, který objevil prvoky pomocí mikroskopu sestrojeného z jednoduchých čoček. Mezi lety 1674 a 1716 popsal kromě volně žijících prvoků několik parazitických druhů a *Giardia lamblia* z vlastní stolice. Prakticky všichni lidé jsou osídleni prvoky žijící v anebo na jejich těle. Takže mnoho lidí je infikováno jedním nebo více druhy po celou dobu jejich života. (Baron, 1996)

Prvoci jsou také samy o sobě důležitým zdrojem potravy pro větší tvory a také základem mnoha potravinových řetězců. Prvoci byli nalezeni téměř ve všech půdách. Žijí i v hlubokém moři, stejně jako v blízkosti povrchových vod. Lze je nalézt i v chladných arktických a antarktických oblastech. (<http://web.archive.org>)

Některé druhy jsou považovány za symbiotické, tj, zpravidla nejsou škodlivé, zatímco jiné jsou patogeny a obvykle vyvolávají onemocnění. Nemoci způsobené prvoky mohou být mírné až život ohrožující. Osoby, jejichž obranyschopnost je schopna kontrolovat, ale ne eliminovat parazitní infekce, se stávají nositeli a představují zdroj infekce pro ostatní. (Baron, 1996)

Mnoho infekcí způsobených prvoky jsou nebezpečné pro imunosupresivní pacienty, zvláště pro lidi se syndromem získaného selhání imunity (AIDS). (Baron, 1996)

Rostliny si vyvinuly strategii pro produkci biologicky aktivních přírodních látek jako prostředek pro svoji ochranu proti býložravcům a mikrobům. Některé rostliny produkují alkaloidy, které mohou vážně poškodit nebo i jedince zabít. Biosyntéza, transport a skladování sekundárních metabolitů jsou obvykle složité procesy, které jsou upraveny v prostoru a čase. (Wink, 2009)

Alkaloidy jsou převážně bezbarvé, pevné a opticky aktivní látky. Většina alkaloidů je v rostlinách vázána jako sůl organických kyselin. (www.biotox.cz)

Funkce sekundárních metabolitů v rostlinách není jednoznačně určena. Avšak silné fyziologické účinky a selektivita některých alkaloidů je příležitostně využita v humánní medicíně. (Grycová *et al.*, 2007)

Alkaloidy jsou velká a strukturálně různorodá skupina sloučenin. Slouží jako základ pro některé významné antibakteriální léky. (Cushnie *et al.*, 2014)

Alkaloidy slouží jako rezervoár celé řady léčiv. Několik alkaloidů izolovaných z rostlin vykazuje antiproliferační, antibakteriální, antivirové, insekticidní a antimetastatické účinky na různé typy rakoviny jak *in vitro*, tak *in vivo*. (Qiu *et al.*, 2014)

2. CÍL PRÁCE

Experimentálně zjistit cytotoxicitu vybraných alkaloidů (kanadin, skulerin, tetrahydropalmin, stylopin) na modelu využívající jednobuněčný organismus *Tetrahymena thermophila* metodou MTT.

3. TEORETICKÁ ČÁST

V této části jsou popsáni prvoci – jejich charakteristika, stavba buňky, reprodukce, výživa a rezistence. Dále se zde nachází zmínka o alkaloidech a jejich výskytu.

3.1. Prvoci

Prvoci jsou jednobuněčná eukaryota. Organismy s eukaryotní buňkou mají těla sestavená z buněk s diferencovaným jádrem a s biomembránovými strukturami. Eukaryotní buňky jsou větší a složitější než prokaryontní. (Jelínek *et al.*, 2000)

3.1.1. Stavba buňky

Stejně jako u všech eukaryot je jádro uzavřeno v membráně. Jednotlivé organely prvoků mají obdobné funkce jako orgány vyšších živočichů. Plazmatická membrána, která obklopuje cytoplazmu, zahrnuje rovněž pohybové aparáty jako například pseudopodia, řasinky a bičíky. Vnější povrchová vrstva některých prvoků, nazývaná pelikula, je dostatečně tuhá pro udržení tvaru. Nicméně se tyto organismy mohou snadno otáčet a ohýbat při pohybu v jejich prostředí. U většiny prvoků je cytoplazma diferencována do *ektoplazmy* (vnější, průhledná vrstva) a *endoplasmy* (vnitřní vrstva obsahující organely). Někteří prvoci mají tzv. buněčná ústa pro konzumaci tekutin nebo pevných částic. (Baron, 1996)

Dále zde jsou mikrotubuly, které mají opornou a pohybovou funkci. Další součástí buňky je jádro. Je to nejdůležitější organela. Může být jedno, dvě (*makronukleus* a *mikronukleus*) nebo více nediferencovaných jader. Obsahuje DNA a také dochází k syntéze RNA. Organelou poskytující energii pro životní pochod buňky je dvojvrstvá membránová mitochondrie. Golgiho aparát zajišťuje sekreční činnost buňky. Pulzující vakuola vylučuje nadbytečnou vodu z buňky a tím udržuje osmotický tlak. (<http://cs.wikipedia.org/>)

3.1.2. Reprodukce

Reprodukce může být asexuální, jako je v amébách a u bičíkovců (kteří infikují člověka), tak obojí- asexuální a sexuální. Nejběžnějším typem asexuálního množení je binární štěpení, ve kterém jsou orgány duplikovány, a prvok se pak rozdělí na dva kompletní organismy. Dvě dceřiné buňky vytvořené z mateřské buňky, uvolní menší potomstvo, které roste do plné velikosti před opakováním procesu. (Baron, 1996)

Rovina dělení v buňkách prvoků se mezi různými skupinami liší a je taxonomicky významná. *Ciliates* se obvykle rozděluje do rovníkové nebo příčné roviny. (<http://www.britannica.com>)

Někteří prvoci mají složité životní cykly, které vyžadují dva různé druhy hostitelů. Jiní vyžadují pouze jednoho hostitele k dokončení životního cyklu. Nicméně reprodukce je omezena událostmi, jako je například smrt hostitele nebo obranné mechanismy hostitele, které mohou parazita eliminovat. (Baron, 1996)

Rychlé tempo množení mnoha parazitů zvyšuje šance k mutacím. Může dojít ke změně ve virulenci, citlivosti na léky a dalších vlastnostech. (Baron, 1996)

3.1.3. Výživa

Výživa všech prvoků vyžaduje organické materiály, které mohou být ve formě částice nebo roztoku. Améby pohlcují částice nebo kapičky přes dočasná ústa. Provedou trávení a následuje vstřebávání v potravní vakuole. Poté se zbaví odpadních látek. Mnoho prvoků má trvalá ústa. Pinocytóza je metoda přijímání výživového materiálu, přičemž se kapalina nasává přes malé dočasné otvory v tělní stěně. Boj o živiny není obvykle důležitým faktorem v patogenezi, protože množství používané parazitickými prvoky je relativně malé. Parazité, kteří obývají tenké střevo, mohou výrazně narušit trávení, vstřebávání a vliv na nutriční stav hostitele. Zničení buněk a tkání hostitele v důsledku metabolické aktivity parazitů zvyšuje výživové potřeby hostitele. To může být významným faktorem u podvyživeného jedince. (Baron, 1996)

Pro prvoky rozlišujeme několik typů výživy. Například saprofytický způsob výživy - schopnost žít na mrtvých organismech nebo produktech jejich rozpadu. Autotrofní výživa - přítomnost fotosyntetického pigmentu umožňující organismu využít energii slunečního světla při zpracování komplexních složek od nejjednodušších

surovin. Heterotrofní výživa - schopnost žít jak saprofytickým tak autotrofním způsobem života. (Luck *et al.*, 1931)

Protozoa mají metabolické dráhy podobné drahám u vyšších živočichů a vyžadují stejné typy organických a anorganických sloučenin. V posledních letech bylo dosaženo významného pokroku při navrhování chemicky definovaného média pro kultivaci *in vitro* u parazitických prvoků. (Baron, 1996)

3.1.4. Rezistence

Schopnost hostitele bránit se proti patogenu se nazývá rezistence. Odolnost proti parazitickým prvokům zahrnuje tři vzájemně související mechanismy: nespecifické faktory, buněčnou imunitu a humorální imunitu. Protozoální infekce způsobuje poškození tkáně vedoucí k nemoci. U chronických infekcí se často objevuje poškození tkáně v důsledku imunitní reakce na parazita. (Baron, 1996)

Parazitičtí prvoci jsou zodpovědní za některé ničivé a převládající onemocnění lidí a domácích zvířat. Tito prvoci ohrožují životy téměř jedné třetiny lidské světové populace a také vedou ke značným ztrátám životů a produktivity domestikovaných zvířat. Množství antiprotozoálních léků je však omezené a to také díky lékové rezistenci. Vznik rezistence parazitických prvoků se stává problémem veřejného zdraví. (Ouellette, 2001)

Rezistence proti parazitickým prvokům se zdá být podobná rezistenci proti jiným infekčním agens, i když mechanismy rezistence v infekcích způsobených prvoky nejsou dosud dobře známy. Rezistence může být rozdělena do dvou hlavních skupin mechanismů: nespecifické mechanismy (jako je například přítomnost nespecifické složky v séru, která je letální pro parazita) a specifický mechanismus zahrnující imunitní systém. (Baron, 1996)

3.2. Alkaloidy

Rostliny obsahující alkaloidy představují velmi různorodou skupinu jak taxonomicky tak chemicky. Přesná definice pojmu alkaloid je poněkud obtížná, protože neexistuje žádná jasná hranice mezi alkaloidy a přirozeně se vyskytujícími aminy. (Evans *et al.*, 2009)

3.2.1. Charakteristika

Rostliny mají schopnost produkovat desítky tisíce vysoce komplexních sekundárních metabolitů, díky nimž mohou přežít a mnohé z nich chrání rostlinu před dravci. Člověk využil tyto sloučeniny sebeobrany jako zdroj léčivých látek a jedů. (<http://www.wiley-vch.de>)

Alkaloidy jsou přírodní látky, které obsahují jeden nebo více dusíkových atomů (obvykle v heterocyklickém kruhu) a mají obvykle definovaný fyziologický účinek na člověka nebo zvíře. Dusík je jediným sjednocujícím faktorem pro různé skupiny. (Evans *et al.*, 2009)

Alkaloid je chemická látka rostlinného původu složená z uhlíku, vodíku a dusíku. Kromě zmíněných prvků obsahuje většina také kyslík. Například nikotin z tabáku je bez kyslíku a je kapalinou. (<http://science.howstuffworks.com>)

Alkaloidy jsou často klasifikovány na základě jejich chemické struktury. Například alkaloidy, které obsahují indol, jsou známy jako indolové alkaloidy. Na tomto principu jsou založeny hlavní třídy alkaloidů jako například izochinolinové, indolové, chinolinové, imidazolové, piridinové, purinové, piperidinové a tropanové. Alkaloidy mohou být případně klasifikovány podle rostliny, ve které se vyskytují - opiové alkaloidy se nacházejí v máku setém (*Papaver somniferum*). (<http://www.britannica.com/>)

Většina alkaloidů je dobře definovanou krystalickou látkou, která se spojuje s kyselinami za vzniku solí. V rostlině mohou existovat ve volném stavu jako soli nebo jako N-oxidy. Ačkoliv barevné alkaloidy jsou relativně vzácné, nejsou neznámé. Například berberin je žlutý a soli sanguinarinu jsou červené. (Evans *et al.*, 2009)

3.2.2. Rozdělení

Alkaloidy lze rozdělit na základě skeletu a biosyntetických prekurzorů do následujících skupin. Alkaloidy odvozené od:

- ornitinu – tropanové, pyrolidinové a pyrolizidinové alkaloidy
- lysinu – piperidinové a chinolizidinové alkaloidy
- kyseliny nikotinové – pyridinové alkaloidy

- fenylalaninu – tetrahydroisochinolinové a benzyltetrahydroisochinolinové alkaloidy
- tryptofanu – indolové alkaloidy
- kyseliny anthranilové – chinolinové a akridinové alkaloidy
- histidinu – imidazolové alkaloidy
- kyseliny mevalonové – terpenové a steroidní alkaloidy
- deriváty xantinu – purinové alkaloidy (Aniszewski, 2007)

3.2.3. Použití

Některé alkaloidy jako nikotin se používají v pesticidech a další se používají jako chemická činidla. Primární použití alkaloidů je v medicíně. Alkaloidy jsou aktivní složky mnoha anestetik, sedativ, stimulantů a relaxancií. Jsou podávány ústy a injekčně pouze pod dohledem lékaře. Použití alkaloidů je nebezpečné, protože většina je návyková a vysoké dávky mohou být toxické. (<http://science.howstuffworks.com>)

Alkaloidy jsou zvláště zajímavé, protože mají spoustu farmakologických účinků: na CNS - ať už jako antidepresiva (morfin, skopolamin) nebo stimulanty (strychnin, kofein), na vegetativní nervový systém: sympatomimetika (efedrin), sympatolytika (yohimbin, některé námelové alkaloidy), parasympatomimetika (pilocarpin), anticholinergika (atropin, hyoscyamin), protinádorové látky (vinblastin), antimalarika (chinin) a antibiotika (berberin). (Bruneton, 1999)

Strychnin, který se používá v malých dávkách jako stimulant a tonikum, je vysoce jedovatý. Chinin, který se používá při léčbě malárie, může způsobit závratě, vezme-li se ve velkých dávkách. Morfin a kokain patří mezi nejúčinnější léky používané pro dočasné zmírnění bolesti, aniž by došlo ke ztrátě vědomí. Nicméně tyto dva alkaloidy jsou návykové a mohou být škodlivé, pokud se v jejich používání pokračuje. (<http://science.howstuffworks.com>)

Léky z alkaloidů obvykle způsobují nepříjemné vedlejší účinky. Z těchto důvodů byly vyvinuty některé syntetické sloučeniny jako náhražky alkaloidů. Například novocain (obchodní název pro prokain) se často používá místo kokainu, a demerol (obchodní název pro meperidin) nahrazuje morfin. Alkaloidní náhražky jsou obvykle méně toxické a méně účinné. (<http://science.howstuffworks.com>) V homeopatii je základní dávka tak nízká, že je neškodná. (Evans *et al.*, 2009)

3.2.4. Výskyt vybraných alkaloidů

Alkaloidy se vyskytují především v rodech semenných rostlin jako mák a tabák. Alkaloidy lze nalézt téměř ve všech částech těchto rostlin, včetně listů, kořenů, semen a kůry. Každá část rostliny obvykle obsahuje několik chemicky příbuzných alkaloidů. Ze stovek alkaloidů v přírodě se jen asi 30 používá komerčně.

(<http://science.howstuffworks.com>)

Atropa belladonna L.

Od dávných dob je tato rostlina známá pro své jedovaté vlastnosti a používala se též v čarodějnictví, kouzelnictví a jiných formách magie. Jméno *Belladonna* pochází z italštiny a znamená "krásná žena". Název pochází z dob, kdy si italské ženy kapaly šťávu z bobulí do očí, aby si je rozšířily. V této době byly velké černé oči považovány za ztělesnění krásy. *Atropa belladonna* obsahuje totiž atropin, který způsobuje dilataci zorniček. (Ratsch, 1998)

Atropa belladonna je jedovatá rostlina. Patří do čeledi *Solanaceae*. Její kořeny, listy a plody obsahují alkaloidy: atropin, hyocyamin a skopolamin. Dosahuje výšky až stopadesát centimetrů. Květy jsou zeleno-fialové a listy jsou oválné. Plody jsou černé, kulovité a sladké. (Berdai *et al.*, 2012)

Atropa belladonna je vytrvalá bylina a patří k nejdůležitějším obchodním zdrojům farmaceutických tropanových alkaloidů, které se používají jako spasmolytika, dále mají mydriatické účinky, zamezují pocitu na zvracení, působí proti nadměrné tvorbě slin, používají se při křečích žaludku a žlučových cest, působí proti astmatu. (Yang *et al.*, 2011)



Obrázek č. 1: *Atropa belladonna*

(<http://francosotgiu1.blogspot.cz/2012/09/flora-sarda-atropa-belladonna.html> ©)

***Hydrastis canadensis* L.**

Hydrastis canadensis je vytrvalá bylina pocházející z listnatých lesů východní Severní Ameriky patřící do čeledi *Hydrastidaceae*. Vzhledem k její léčivosti byly oddenky široce sbírány a v současné době je vedena jako ohrožená ve více než jedné třetině států, kde roste. (Albrecht *et al.*, 2006)

Hydrastis canadensis obsahuje vápník, železo, mangan, vitamin A, vitamin C, vitamin E, B-komplex, a další živiny a minerály. Kořeny a oddenky obsahují mnohé isochinolinové alkaloidy - hydrastin, berberin a kanadin. Předpokládá se, že vysoký obsah těchto alkaloidů dává rostlině antibiotické, protiinfekční a imunostimulační vlastnosti. (<http://www.herbwisdom.com>)

Zejména se jedná o alkaloid berberin. Ten je s největší pravděpodobností zodpovědný za účinek vztažený na bakterie, prvoky, houby, streptokoky. Pomáhá při infekci sliznic- ústní dutiny, hrdla, průdušek, urogenitálního traktu a gastrointestinálním traktu. Rostlina čistí a podporuje funkce žláz zvýšením průtoku žluči a trávicích enzymů. Klinické studie ukázaly, že je účinná při léčbě průjmu způsobeného *E. coli* (cestovatelský průjem), *Salmonella paratyphi* (otravy jídlem) a *Vibrio cholerae* (cholera). (<http://www.herbwisdom.com>)



Obrázek č. 2: *Hydrastis canadensis*

(<http://www.sunfarm.com/images/med/hydrastiscanadensis7-m.jpg> ©)

***Corydalis cava* L.**

Corydalis cava je vytrvalá bylina dorůstající až 30 cm a patří do čeledi *Fumariaceae*. Má velkou dutou podzemní hlízu. Květy rostou v přímém hroznu. Tobolky jsou dlouhé a zobákovitě zúžené. Kvete od března do května. Nachází se v nížinách až do podhůří. (Toman *et al.*, 2001)

Corydalis cava je rostlina, která má mnohá farmakologická využití. Patří do čeledi *Papaveraceae*. Rostlina vytváří značné podzemní hlízy. Ty jsou bohatým zdrojem mnoha biologicky účinných látek s rozsáhlým použitím v evropské a asijské lidové medicíně. Mají analgetický, sedativní, protizánětlivý, antialergický a protinádorový účinek. Hlízy obsahují isochinolinové alkaloidy jako například bulbocapnin, corydalin, tetrahydropalmin a skulerin. (Nawrot *et al.*, 2010)



Obrázek č. 3: *Corydalis cava*

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Corydalis_cava_Bulb.jpg

©)

***Chelidonium majus* L.**

Chelidonium majus je vytrvalá bylina. Patří do čeledi *Papaveraceae*. Dorůstá výšky až 70 cm. Květy jsou žluté, tobolka čárkovitá. Rostlina kvete od května až do října. Roste ve stinných hájích, křovinách od nížin do podhůří. (Toman *et al.*, 2001)

Chelidonium majus je jedovatá alkaloidní droga s flavonoidy a řadou dalších látek. Jako droga se využívá kvetoucí nať, kořen a oranžová šťáva. Má mnohé farmakologické využití jako spasmolytikum, cholagogum, sedativum a antialergikum. Spolehlivě tlumí kolikové bolesti a žlučník. Působí mírně močopudně. Lidově se používá i na vyleptávání bradavic čerstvou šťávou. (Zentrich, 1991)

Rostlina je bohatá na benzyloisoquinolinové alkaloidy jako například: protopin, chelidonin, stylopin, coptisin, berberin, sanguinarin a chelerytrin. (NewsRx, 2015)



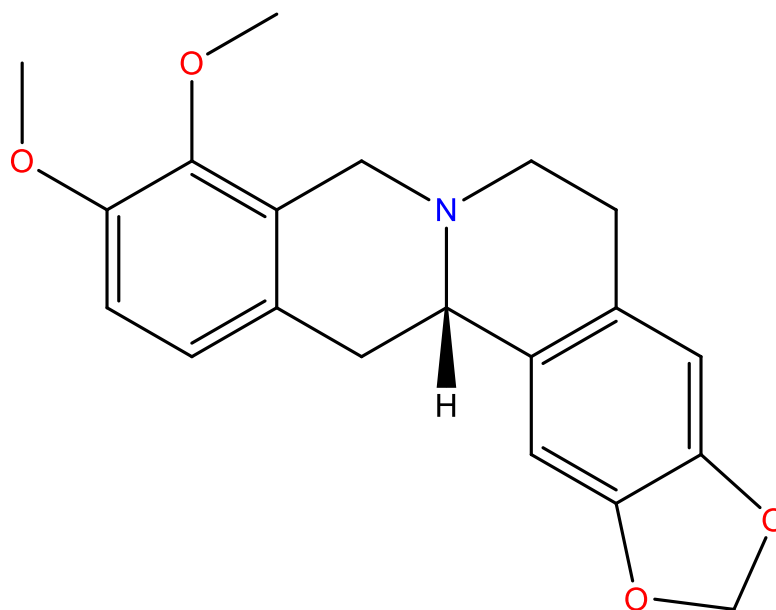
Obrázek č. 4: *Chelidonium majus*

(<http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Chelidonium-asiaticum-4.jpg> ©)

3.3. Testované látky

3.3.1. Kanadin

Vzorec:



Obrázek č. 5: Vzorec kanadinu (vytvořeno v programu ChemDraw Pro 12.0)

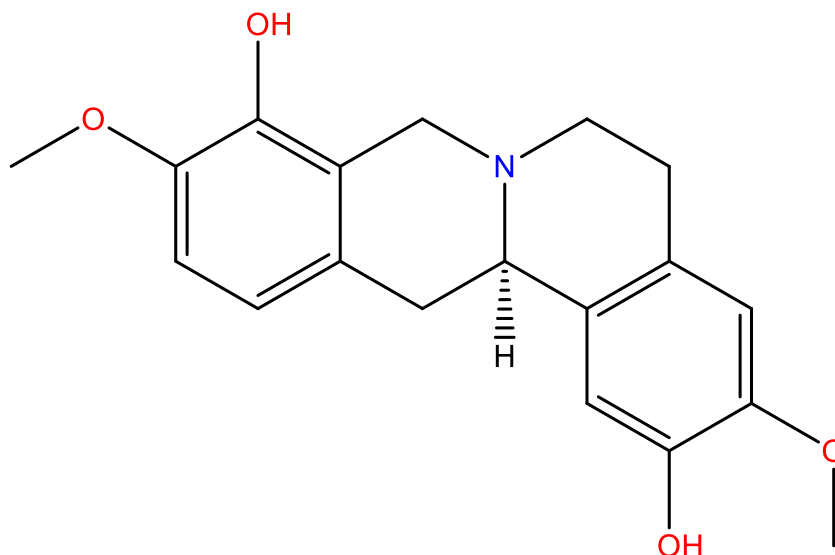
Molekulární vzorec: $C_{20}H_{21}NO_4$

Molekulová hmotnost: 339,39 g/mol

Systematický název: 5,8,13,13a-Tetrahydro-9,10-dimethoxy-6H-benzo(g)benzo-1,3-dioxolo(5,6-a)quinolizine (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> -c)

3.3.2. Skulerin

Vzorec:



Obrázek č. 6: Vzorec skulerinu (vytvořeno v programu ChemDraw Pro 12.0)

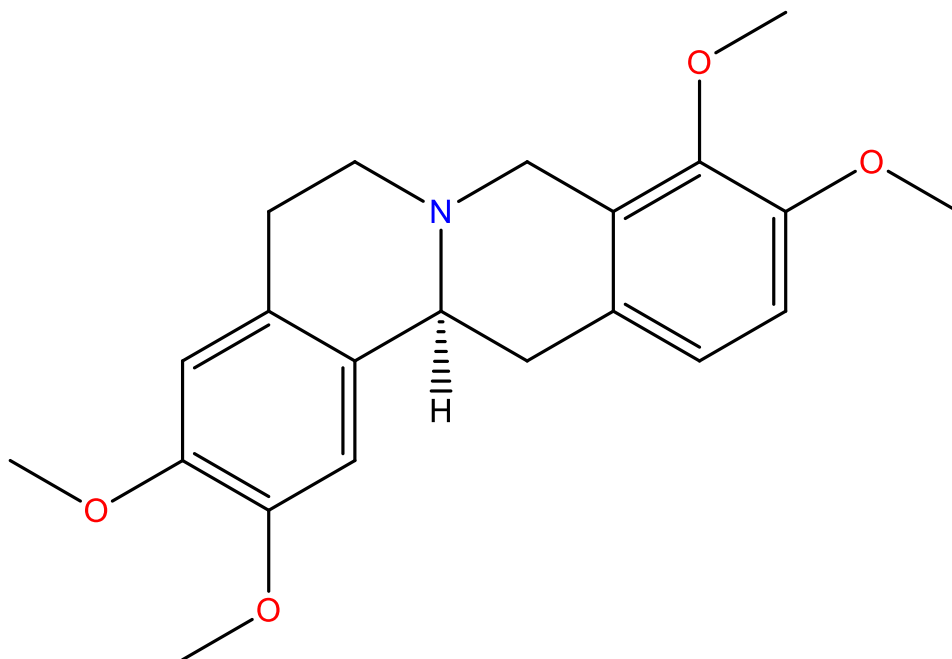
Molekulární vzorec: **C₁₉H₂₁NO₄**

Molekulová hmotnost: 327,37 g/mol

Systematický název: (13a*S*)-3,10-dimethoxy-5,8,13,13a-tetrahydro-6*H*-isoquino[3,2-*a*]isoquinoline-2,9-diol (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> -b)

3.3.3. Tetrahydropalmatin

Vzorec:



Obrázek č. 7: Vzorec tetrahydropalmatinu (vytvořeno v programu ChemDraw Pro 12.0)

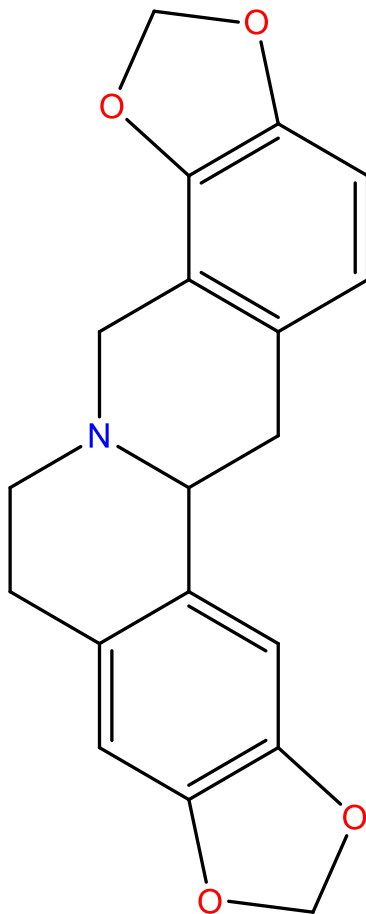
Molekulární vzorec: $C_{21}H_{25}NO_4$

Molekulová hmotnost: 355,43 g/mol

Systematický název: 5,8,13,13a-Tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-6H-dibenzo(a,g)quinolizine (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> -d)

3.3.4. Stylopin

Vzorec:



Obrázek č. 8: Vzorec stylopinu (vytvořeno v programu ChemDraw Pro 12.0)

Molekulární vzorec: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_4$

Molekulová hmornost: 323,34 g/mol

Systematický název: 6,7,12b,13-Tetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-g][1,3]dioxolo[7,8]isoquinolino[3,2-a]isoquinoline (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> - a)

3.4. Testovací organismus *Tetrahymena* sp.

(Ehrenberg, 1830) Lwoff, 1947 – zdroj (Hill, 1972)



Obrázek č. 9: *Tetrahymena thermophila* pod mikroskopem Leica DMIL - zvětšení 100x (foto autor)

3.4.1. Zařazení

Doména: *Eukaryota*

Organismus skládající se z jedné nebo více buněk, z nichž každá má jádro a jiné dobře vyvinuté intracelulární části. Eukaryota zahrnují všechny organismy kromě bakterií, virů a některých řas. Mezi Eukaryota patří houby, zvířata a rostliny. Eukaryotické buňky jsou asi 10 - krát větší než prokaryotní a mohou mít až 1000 krát větší objem. (<http://www.medicinenet.com>)

Klasifikace eukaryot poskytuje základní rozdělení pro ekologický, lékařský a průmyslový výzkum. V posledních letech jsou eukaryota rozdělena do šesti hlavních skupin: *Améby*, *Archaeplastida*, *Chromalveolata*, *Excavata*, *Opisthokonta*, a *Rhizaria*. (Kim *et al.*, 2008)

Říše: *Chromalveolata*

Podříše: *Alveolata*

Kmen: *Ciliophora*

Ciliophora je název pro kmen prvoků zvaných nálevníci. Nálevníci jsou jedny z nejsložitějších buněk, které mají komplikovaný cytoskelet, řasinky a dva různé druhy jader. (Lynn *et al.*, 2012)

Nálevníky kryje kortex. Části kortexu jsou také tzv. alveoly. Jsou to váčky v buněčné membráně, které obsahují roztoky polysacharidů a bílkovin. Těž se zde nacházejí trichocysty, které jsou váčkovitého charakteru, mající ochrannou funkci. Ochrana je zajištěna nabobtnáním bílkovinných vláken trichocyst, které vytvářejí slizový obal kolem buňky. (Sedlák, 2003)

Nálevník přijímá potravu buněčnými ústy, která přecházejí uvnitř buňky v nálevkovitý hltan. Potrava se do hltanu dostává vířením příústních brv. Na konci hltanu se nachází potravní vakuola. Odpadní látky jsou vylučovány buněčnou řití. Látky rozpustné ve vodě jsou vylučovány dvěma pulzujícími vakuolami. (Jelínek *et al.*, 2000)

Další součástí nálevníků je *makronukleus* a *mikronukleus*. Jedná se o jaderný dualismus. *Makronukleus* je zodpovědné za látkovou výměnu a pohyb, *mikronukleus* je důležité při pohlavním rozmnožování-konjugaci. Nálevníci též mohou svou populaci zvětšovat pučením nebo rozpadem buňky. (Sedlák, 2003)

Volně žijící nálevníky lze nalézt v téměř jakémkoliv prostředí, které obsahuje vodu - v půdě, horkých pramenech a antarktickém mořském ledu. *Ciliophora* jsou největší dravci v mikrobiální potravní síti. (Lynn *et al.*, 2012)

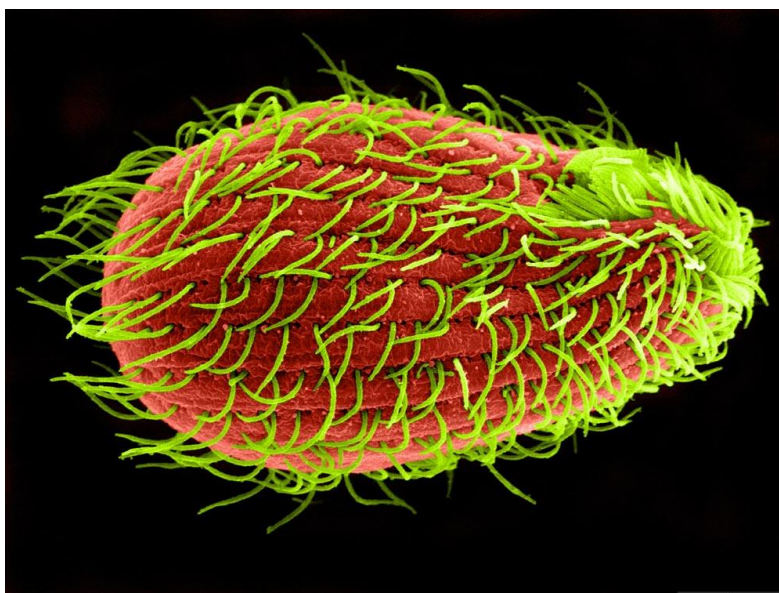
Třída: *Oligohymenophorea*

Řád: *Hymenostomatida*

Čeleď: *Tetrahymenidae*

Rod: *Tetrahymena*

Druh: *Tetrahymena thermophila* (Sedlák, 2003)



Obrázek č. 10: *Tetrahymena thermophila*

(http://voices.nationalgeographic.com/files/2013/04/SciSource_BV2389-as-Smart-Object-1-copy.jpg ©)

3.4.2. Charakteristika

Tetrahymena thermophila je jednobuněčný modelový organismus pro jednobuněčnou eukaryotní biologii. Studium *T. thermophila* přispělo k základním biologickým objevům jako je například telomerické opakování, telomerázy a acetylace histonů. *T. thermophila* je výhodná jako modelový eukaryotní systém, protože rychle roste ve vysoké hustotě, v různých médiích a podmínkách. Její životní cyklus umožňuje použití běžných nástrojů genetické analýzy a molekulárně genetických nástrojů. (Eisen *et al.*, 2006)

Tetrahymena je sladkovodní jednobuněčný organismus dlouhý asi 40 až 60 mikrometrů. Živí se bakteriemi. Vyznačuje se třemi výraznými rysy, které jsou: cilie - mohou být speciálně určené pro pohyb nebo zachycení potravy, alveolární membrány-leží těsně pod plasmatickými membránami a jaderný dualismus. (Cole, 2000)

3.4.3. Rozmnožování

Buňky nálevníků, tedy i buňky *T. thermophila* vykazují jaderný dimorfismus. Každá buňka má dvě jádra, *micronucleus* (MIC) a *macronucleus* (MAC), které obsahují odlišné, ale úzce související genomy. MIC je diploidní a obsahuje pět párů chromozómů. Je to sklad genetické informace pro potomstvo vyrobené konjugací v sexuální fázi *T. thermophila* životního cyklu. Po vytvoření MAC se buňky množí asexuálně až do další sexuální konjugace. MAC je tak považováno za somatické jádro. (Eisen *et al.*, 2006)

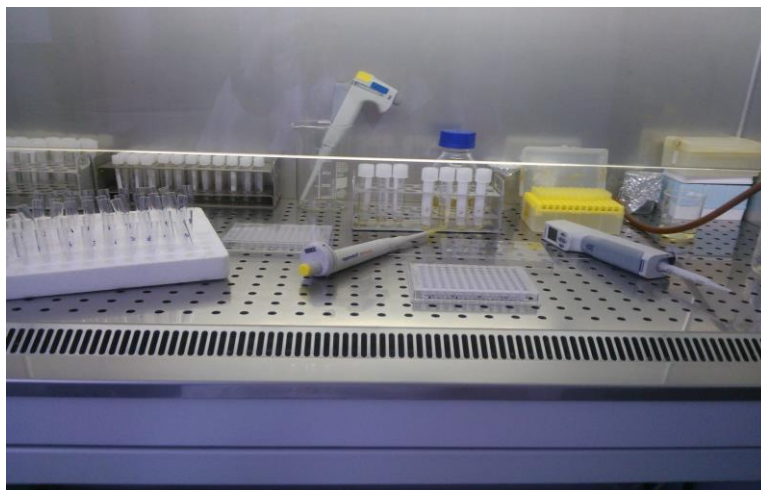
Během vegetativního růstu se množí binárním štěpením. U tetrahymeny jde o pozoruhodnou reorganizaci kortikálního cytoskeletu. (Cole, 2000)

Konjugace: Jedinci se k sobě přiblíží buněčnými ústy. Když se rozpadne makronukleus, tak se v každém jedinci dvakrát rozdělí mikronukleus. Z něj se vytvoří čtyři jádra, ze kterých tři degenerují a jádro nejbližší k buněčným ústům se redukčně rozdělí na menší haploidní jádro (migratorní) s funkcí samčí a větší (stacionární) se samičí funkcí. Dochází k výměně migratorních jader. Poté následuje splnutí stacionárního jádra s výměněným jádrem migratorním, vzniká tzv. vícejaderný synkaryon. (Jelínek *et al.*, 2000)

Dalším krokem je oddálení jedinců a probíhají tři za sebou jdoucí jaderná dělení, kdy se vytvoří 4 krát makronukleus a 4 krát mikronukleus. Makronukleus se nemění, třikrát mikronukleus zaniká a čtvrtý se mitoticky dělí. Následuje příčné dělení, kdy dojde k rozdělení „exkonjugantů“, a každý obsahuje dvakrát makronukleus a jeden mikronukleus. Dělení mikronukleusu a dělení buňky se opět opakuje. Nakonec vznikají 4 plus 4 noví jedinci. (Jelínek *et al.*, 2000)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V tomto oddílu je popsána metoda k vyhodnocení výsledků, dále přístroje, pomůcky, chemikálie a postupy provedení testů.



Obrázek č. 11: Pomůcky k vyhotovení testu (foto autor)

4.1. Metoda

Životaschopnost prvoků *Tetrahymena* byla stanovena z hlediska koncentrace MTT a inkubační době. Testy založené na redukci tetrazolinového barviva jako MTT byly rozsáhle používány při hodnocení *in vitro* buněčné proliferace a cytotoxicity. (Dias *et al.*, 1999)

MTT je kvantitativní metoda, která je založená na snížení tetrazolinového barviva. Výroba intenzivně zbarvených, ve vodě nerozpustných formazanových krystalů, je výsledkem testu na snížení tetrazolinu. (Dias *et al.*, 1999)

Formazanové krystaly mohou být pozorovány mikroskopicky v buněčné cytoplazmě nebo rozpuštěny organickými rozpouštědly, jako je například DMSO, které umožňuje spektrofotometrickou kvantifikaci. (Dias *et al.*, 1999)

4.2. Chemikálie, přístroje, pomůcky

4.2.1. Užívané chemikálie

Kanadin hydrochlorid (Mr= 375,85)

Skulerin hydrochlorid (Mr= 363,83)

Tetrahydropalmatin hydrochlorid (Mr= 391,89)

Stylopin hydrochlorid (Mr= 359,80)

Dichroman draselný (FLUKA)

Deionizovaná voda

Proteose-pepton (FLUKA)

MMT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid) (SIGMA - ALDRICH)

DMSO (dimetyl-sulfoxid) (SIGMA – ALDRICH)

Níže uvedené alkaloidy byly získány na katedře farmaceutické botaniky a ekologie:

5/047 (-)-kanadin byl izolovaný z *Hydrastis canadensis*;

3/001 (-)- skulerin byl izolovaný z *Corydalis cava*;

0/009 (+)-tetrahydropalmatin byl izolovaný z *Corydalis cava*;

3/007 (-)-stylopin byl izolovaný z *Chelidonium majus*.

Alkaloidy se převedly na hydrochloridy v bezvodém diethyletheru, do kterého byl zaveden plynný chlorovodík, který se připravil *in situ* reakcí kyseliny sírové s chloridem sodným. (e-mailové sdělení PharmDr. J. Chlebek, Ph.D.)

4.2.2. Užívané přístroje

Analytické digitální váhy KERN ABJ

Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN

Třepačka VORTEX-GENIE 2

Box s laminárním prouděním AURA 2000 M.A.C

Počítač

Reader ANTHOS 2010

Mikroskop



Obrázek č. 12: Box s laminárním prouděním AURA 2000 M.A.C
(foto autor)

4.2.3. Užívané pomůcky

Eppendorfovy zkumavky

Malé zkumavky

Stojan na zkumavky

Lžičky

Kádinky

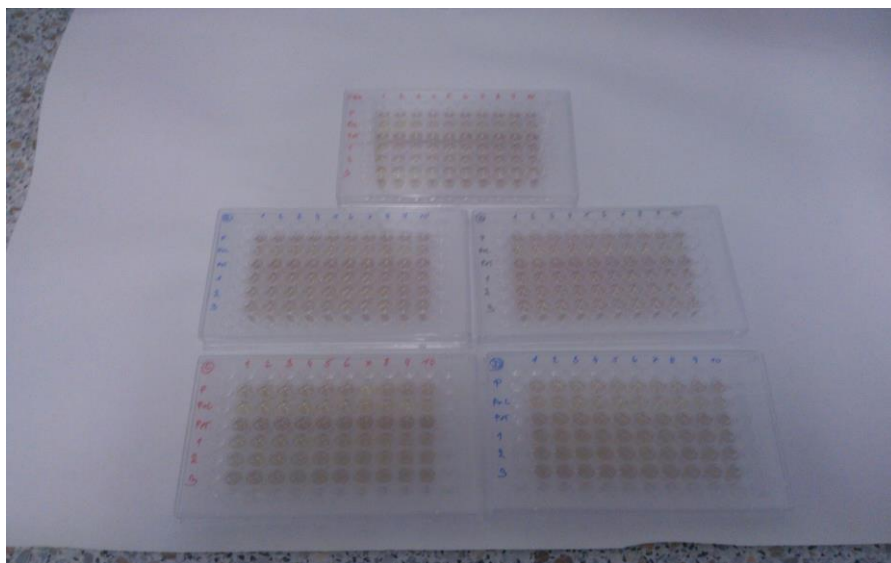
Automatické mikropipety a špičky

96-jamková mikrotitrační destička

Latexové rukavice

Lihový fix

4.3. Vyhotovení testu



Obrázek č. 13: Mikrotitrační destičky (foto autor)

4.3.1. Příprava

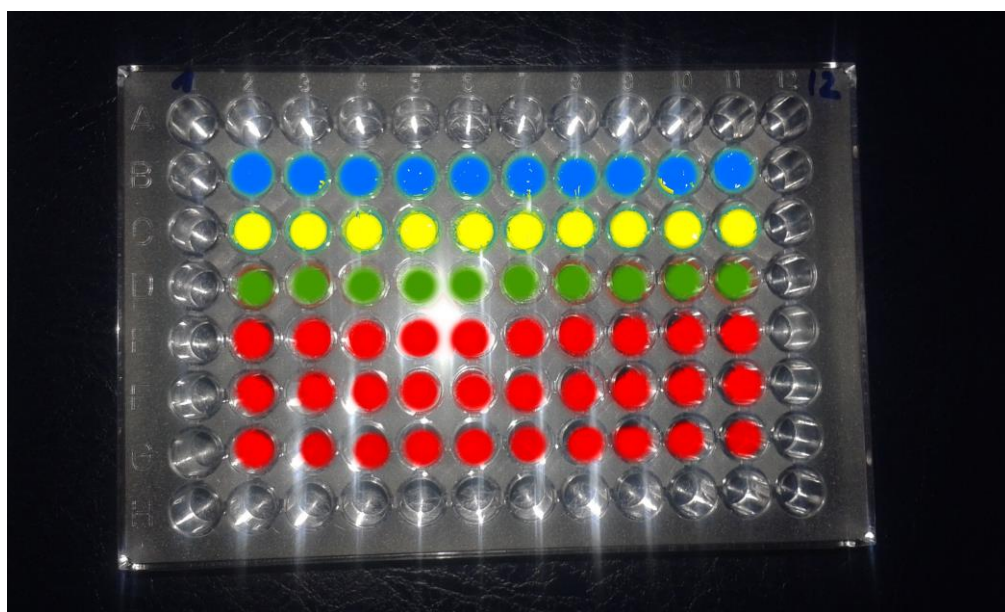
Zkoušené látky byly naváženy do Eppendorfových zkumavek na analytických vahách a rozpuštěny v deionizované vodě. Pro lepší rozpustnost byly zkumavky vloženy do ultrazvukové lázně na 10-30 minut.

Ředícím koeficientem 1,5 vznikla řada 10 zkumavek s postupně klesající koncentrací od všech testovaných látek.





V laminárním boxu pokračovala další příprava testu. Do jednotlivých jamek v mikrotitrační destičce se postupně přidávaly následující látky. Nejprve se do každé jamky napipetoval pepton. Poté se k peptonu do druhé řady a třech testovaných řad přidala zkoušená látka od nejvyšší koncentrace k té nejnižší. Do třetí řady a ke třem testovaným řadám se pak přidal roztok *Tetrahymena thermophila*.

Takto hotové destičce byla změřena optická hustota pomocí readeru ANTHOS 2010 při vlnové délce 492 nm. Pak byla destička dána do inkubátoru.

Po 1 hodině od naplnění jamek přidáno 10 μ l MTT. Destička byla inkubována při 20°C. Po 5 hodinách se přidalo 150 μ l DMSO. Měření optické hustoty probíhalo v čase 0, po 1 hodině, 5 hodinách, 5 a půl hodině, 6 hodinách a 23,5 hodině.



Obrázek č. 14: Mikrotitrační destička se znázorněnými látkami (foto autor + úprava v Zoner Photo Studio 17)

-  pepton
-  pepton + testovaná látka
-  pepton + *Tetrahymena thermophila* (kontrola)
-  pepton + testovaná látka + *Tetrahymena thermophila*

Tabulka č. 1: Koncentrace testovaných látek ve zkumavkách

Zkumavka č.	Koncentrace kanadinu [mmol/l]	Koncentrace skulerinu [mmol/l]	Koncentrace tetrahydropal- matinu [mmol/l]	Koncentrace stylopinu [mmol/l]	Koncentrace dichromanu [mmol/l]
1.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2.	0,666	0,666	0,666	0,666	0,666
3.	0,444	0,444	0,444	0,444	0,444
4.	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296
5.	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197
6.	0,131	0,131	0,131	0,131	0,131
7.	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087
8.	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058
9.	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039
10.	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026

4.3.2. Vyhodnocení

Na konci MTT testu byly naměřeny hodnoty absorbancí spektrofotometrickým měřením intenzity zbarvení jamek. V každém z testů jednotlivých testovaných vzorků byla přítomna negativní kontrola se stejným objemem rozpouštědla jako u jamek s testovanými vzorky.

Hodnota absorbance negativní kontroly byla vzata jako 100% hodnota redukce MTT buňkami v dané 96 - jamkové destičce. Hodnoty absorbancí jednotlivých koncentrací testovaných látek byly přepočítány na % hodnoty negativní kontroly. Všechny testované koncentrace jednotlivých vzorků byly nanášeny na destičky triplicitně. Test samotný byl třikrát opakován.

Výsledné hodnoty byly použity k vytvoření grafu závislosti procenta inhibice *Tetrahymena thermophila* na koncentraci zkoušené látky.

5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Každá testovaná látka byla zkoušená nejméně třikrát i s přidáním MTT a DMSO. Jednotlivé měření byla zaznamenána do tabulek.

Pro kontrolu citlivosti testu a správného provedení byl použit dichroman draselný. Jeho střední inhibiční koncentrace $IC_{50} = 7,153 \pm 3,062$ mmol/l .

Ze stanovených hodnot byly vytvořeny grafy závislosti procenta inhibice testovaného organismu na koncentraci zkoušených látek.

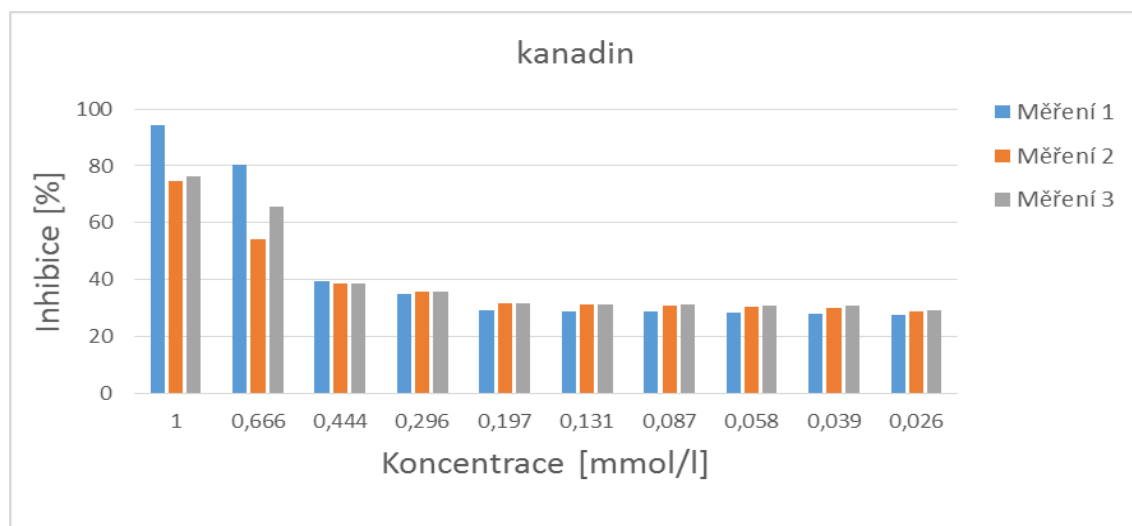
Dále díky programu GraphPad Prism 5 Project byly vypočítány hodnoty střední inhibiční koncentrace IC_{50} .

5.1. Kanadin

Tabulka č. 2: Procentuální inhibice kanadinu

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice pro 3 měření [%]		
1,0	94,53	74,72	76,17
0,666	80,25	54,19	65,46
0,444	39,23	38,52	38,60
0,296	34,97	35,88	35,74
0,197	29,20	31,43	31,58
0,131	28,90	31,23	31,37
0,087	28,60	30,83	31,36
0,058	28,30	30,22	30,72
0,039	28,00	30,02	30,70
0,026	27,38	28,60	29,18

Obrázek č. 15: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci kanadinu



Hodnota střední inhibiční koncentrace kanadinu:

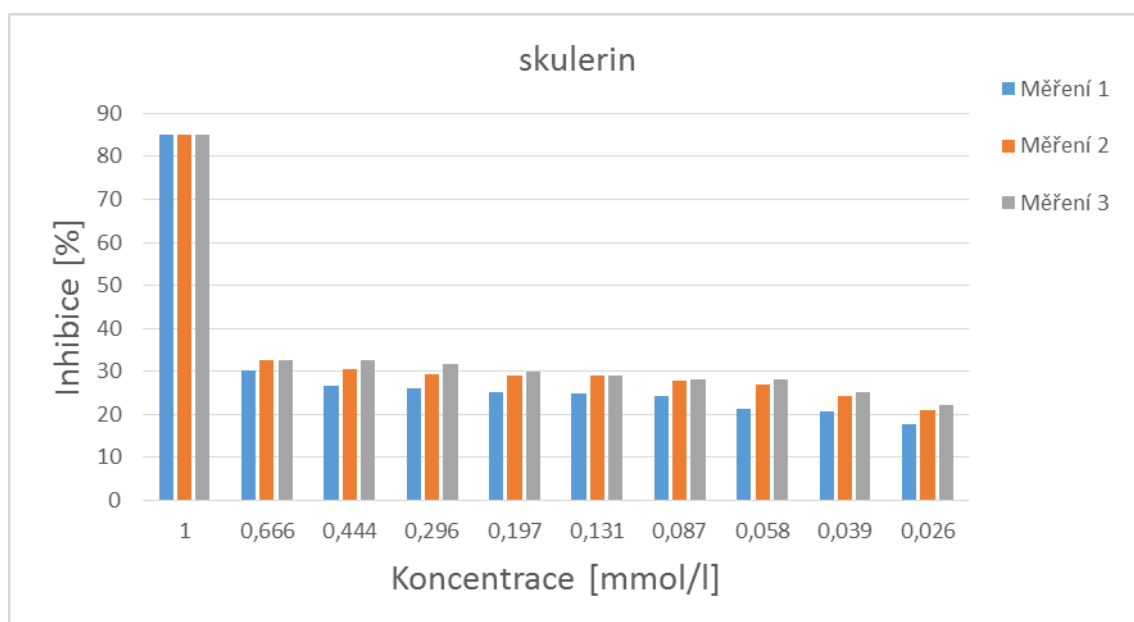
$$IC_{50} = 0,375 \pm 0,085 \text{ mmol/l}$$

5.2. Skulerin

Tabulka č. 3: Procentuální inhibice skulerinu

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice pro 3 měření [%]		
1,0	85,00	85,00	85,00
0,666	30,21	32,67	32,53
0,444	26,53	30,40	32,53
0,296	25,92	29,37	31,84
0,197	25,31	28,96	30,07
0,131	25,00	28,96	29,18
0,087	24,40	27,72	28,28
0,058	21,33	27,01	28,07
0,039	20,72	24,20	25,16
0,026	17,81	21,00	22,25

Obrázek č. 16: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci skulerinu



Hodnota střední inhibiční koncentrace skulerinu:

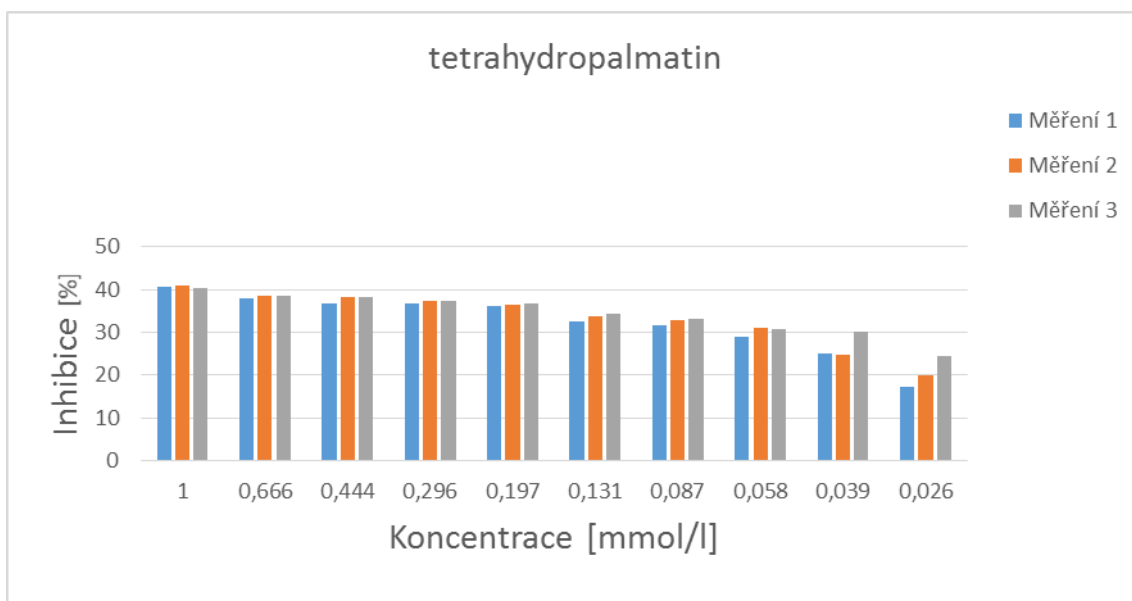
$$IC_{50} = 0,750 \pm 0,043 \text{ mmol/l}$$

5.3. Tetrahydropalmatin

Tabulka č. 4: Procentuální inhibice tetrahydropalmatinu

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice pro 3 měření [%]		
1,0	40,57	40,85	40,40
0,666	37,98	38,60	38,44
0,444	36,69	38,37	38,19
0,296	36,69	37,47	37,45
0,197	36,26	36,57	36,72
0,131	32,39	33,87	34,27
0,087	31,52	32,75	33,04
0,058	28,94	31,17	30,83
0,039	25,06	24,65	30,10
0,026	17,31	20,04	24,45

Obrázek č. 17: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci tetrahydropalmatinu



Hodnota střední inhibiční koncentrace tetrahydropalminu:

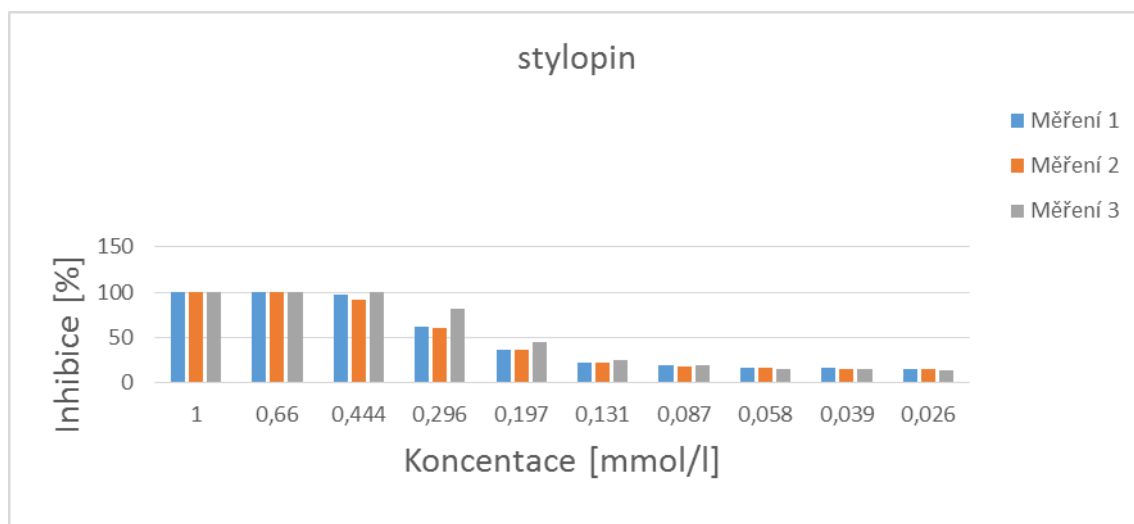
$$IC_{50} = 4,439 \pm 1,909 \text{ mmol/l}$$

5.4. Stylopin

Tabulka č. 5: Procentuální inhibice stylopinu

Koncentrace [mmol/l]	Inhibice pro 3 měření [%]		
1,0	100	100	100
0,666	100	100	100
0,444	96,75	91,42	100
0,296	62,40	60,07	81,89
0,197	36,73	35,97	45,22
0,131	22,63	22,77	24,79
0,087	19,74	18,15	19,22
0,058	16,49	17,16	15,04
0,039	16,85	15,84	150,4
0,026	14,68	15,18	13,65

Obrázek č. 18: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci stylopinu



Hodnota střední inhibiční koncentrace stylopinu:

$$IC_{50} = 0,202 \pm 0,015 \text{ mmol/l}$$

6. DISKUSE

Rostliny zůstávají nejčastějším zdrojem antimikrobiálních látek. Jejich používání je stále velmi populární. (Singh *et al.*, 2012) Po celá staletí byl člověk vystavován patogenním mikroorganismům. Prvoci tvoří hlavní skupinu a stojí na prvním místě v rozvoj lidských nemocí. Protozoální útoky jsou běžné v různých částech světové populace a představují hlavní příčinu úmrtnosti v rozvojových zemích. I když značná část antiprotozoálních léků je k dispozici, většina z nich je jedovatá nebo méně efektivní. Proto by se měly vymýšlet nové a účinnější léky z přírodních zdrojů. (Shibumon *et al.*, 2010)

V posledních letech vynaložily farmaceutické společnosti spoustu času a peněz na vývoj přírodních produktů extrahovaných z rostlin. Rostlinné materiály jsou i nadále důležitým zdrojem látek v boji proti závažným chorobám celého světa. Tradiční léčivé metody, zejména používání léčivých rostlin, hraje stále důležitou roli v rozvojových zemích. Léčivá hodnota těchto rostlin spočívá v obsahu některých chemicky účinných látek, které vyvolávají fyziologický efekt na lidský organismus. Mezi nejdůležitější složky rostliny patří alkaloidy, trísloviny, flavonoidy a steroidy. Proto by mělo být v zájmu prozkoumat tyto rostliny. Jak za účelem potvrzení jejich použití v lidové medicíně, tak odhalení jejich účinné látky. (Singh *et al.*, 2012)

V této práci byla pozorována antiprotozoální aktivita alkaloidů – kanadinu, skulerinu, tetrahydropalmatinu a stylopinu. Testy byly prováděny na typickém modelovém laboratorním organismu – jednobuněčná *Tetrahymena thermophila*.

V tabulce níže je uvedena hodnota střední inhibiční koncentrace IC₅₀ pro každou testovanou látku zvlášť.

Tabulka č. 6: Získané střední inhibiční koncentrace testovaných látek

LÁTKA	HODNOTA IC ₅₀ [mmol/l]
Kanadin	0,3753 ± 0,085
Skulerin	0,7497 ± 0,043
Tetrahydropalmatin	4,439 ± 1,909
Stylopin	0,2024 ± 0,015

Kanadin

Z prvních testovaných látek byl kanadin. Jedna ze studií se zabývá cytotoxicitou určitých alkaloidů. Cytotoxické účinky čtyř alkaloidů: berberinu, kanadinu, anonainu, a antioquinu byly hodnoceny pomocí tří různých buněčných kultur. Výsledky ukazují, že berberin, anonain, a antioquin mají významný cytotoxický účinek. Naproti tomu kanadin má menší cytotoxický efekt. Dále výsledky prokázaly, že má kanadin významnou antioxidační aktivitu. (Correché *et al.*, 2008)

Cílem další studie bylo porovnat složení a antibakteriální aktivitu ethanolických extraktů připravených z kořenů a nadzemních částí *H. canadensis*. Extrakty alkaloidů byly testovány skrz inhibiční aktivitu na *Staphylococcus aureus*. Pro kanadin byla hodnota IC₅₀=0,750 μmol/l. (Ettefagh *et al.*, 2011)

V jiné studii byl izolován tetrahydroberberin (kanadin) z *Corydalis cava*. Bylo zjištěno, že má mikromolární afinitu k dopaminovým D2 a serotoninovým 5-HT (1A) receptorům. Perorální podání mělo za následek výrazné zrychlení vyprazdňování žaludku testovaných krys, ale také bylo obnoveno zpožděné vyprazdňování žaludku zapříčiněné apomorfínem. Tato zjištění mají terapeutický potenciál k léčbě funkční dyspepsie. (Lee *et al.*, 2011)

Při nejvyšších koncentracích našeho pokusu došlo téměř k 100% inhibici *Tetrahymena thermophila*. S klesající koncentrací se inhibice snižovala.

Skulerin

Další testovanou látkou byl skulerin. Chemické studie čínské byliny *Corydalis saxicola* vedly k izolaci a identifikaci 14 alkaloidů. Všechny izolované sloučeniny byly testovány na inhibiční aktivitu proti lidské DNA topoizomeráze I. Z izolovaných alkaloidů pallidin a skulerin vykazovaly silnou inhibiční aktivitu vůči topoizomeráze I, která byla srovnatelná s kamptotecinem - typickým inhibitorem topoizomerázy I. Předběžná studie vztahu mezi strukturou a aktivitou ukazuje, že kvarterní amonný iont může hrát důležitou roli v inhibici topoizomerázy I. (Cheng *et al.*, 2008)

V našem pokusu byla zjištěna 85% inhibice *Tetrahymena thermophila* při nejvyšší koncentraci.

Na tento alkaloid nebylo bohužel provedeno mnoho studií, takže naše výsledky nelze s ničím porovnat.

Tetrahydropalmatin (THP)

Třetí testovanou látkou byl tetrahydropalmatin. V následující studii byl použit levo-tetrahydropalmatin, který byl extrahován z *Corydalis* a *Stephania*. Je obsažen ve velkém množství tradičních čínských rostlinných přípravků. Ve srovnání s jinými antagonisty dopaminových receptorů, má tetrahydropalmatin nižší afinitu k receptorům D2 než pro receptory D1. Studie ukázala, že se tetrahydropalmatin také váže k receptorům D3, případně funguje jako antagonist. Unikátní farmakologický profil THP naznačuje, že by mohl být účinný při léčbě závislosti na opiátech. Ve studii byly zkoumány účinky THP a heroinu u potkanů. Bylo zjištěno, že THP snížil potřebu užití heroinu a inhibuje jeho opětovné vyhledávání. (Yue *et al.*, 2012)

V další studii byl tetrahydropalmatin izolován z *Corydalis yanhusuo*. Tato rostlina má prokázaný analgetický účinek. Avšak potenciální analgetický účinek její aktivní složky - levotetrahydropalmatinu nebyl zaznamenán v projevech neuropatické bolesti. Ačkoliv se THP používá v Číně pro léčbu mírné až středně silné bolesti, včetně bolesti hlavy, toto je první studie, která identifikovala antinociceptivní účinky L-THP v myším modelu pro chemoterapeutické látky vyvolávající neuropatické bolesti. (Guo *et al.*, 2014)

Dále byly testovány tři alkaloidy: cepharanthin, tetrahydropalmatin a xylopinin izolované z hlízy *Stephania rotunda* na jejich cytotoxickou aktivitu ve vzorku lidských nádorových buněk (HT29, LS174T, SW620 a HepG2). Celý pokus byl vyhotoven pomocí testu MTT. V této studii se cepharanthin vyznačoval silnou cytotoxicitou s IC_{50} mezi hodnotami 2,4 a 5,3 μM , zatímco tetrahydropalmatin a xylopinin způsoboval slabou cytotoxicitu. Bylo zjištěno, že tyto alkaloidy jsou non-mutagenní pro dávky až na 8,2 μM . (Bun *et al.*, 2009)

Během našeho pokusu došlo k inhibici menší než 50% u nejvyšší testované koncentrace 1 mM. *Tetrahymena thermophila* působila při nejvyšší koncentraci nejživěji ze všech testovaných alkaloidů.

Stylopin

Poslední testovanou látkou byl stylopin. Čtyři druhy rodu *Fumaria* (*F. vaillantii*, *F. parviflora*, *F. rostellata* a *F. jankae*) byly stanoveny za účelem zjištění přítomnosti isochinolinových alkaloidů allocryptopinu, chelidoninu, protopinu, bikukulinu, sanguinarinu, cheliritrinu, stylopinu a hydrastinu pomocí metody HPLC-DAD. Protopin a sanguinarin byl přítomen ve všech vzorcích. Bikukulin a stylopin byl nalezen ve *F. vaillantii* a *F. parviflora*, zatímco chelidonin byl identifikován pouze u *F. vaillantii*, hydrastin v *F. jankae*. Nejbohatší druh obsahující isochinolinové alkaloidy byl *F. parviflora*. Tato studie ukázala významné rozdíly mezi čtyřmi druhy *Fumaria* - jak kvalitativní tak kvantitativní. (Paltinean *et al.*, 2013)

V další studii byly testovány dva alkaloidy- chelidonin a stylopin. Látky byly izolovány z celých rostlin *Chelidonium majus* L. var. *asiaticum*, a jejich struktury byly identifikovány spektroskopickými metodami. Alkaloidy byly zkoumány *in vitro* pro jejich cytotoxickou aktivitu na buňky lidské rakoviny – prostaty, prsu, plic, jater a karcinom tlustého střeva. Hodnoty IC_{50} pro chelidonin ukázaly významnou cytotoxickou aktivitu proti rakovině prsu a tlustého střeva s hodnotami IC_{50} 8,3 a 5,9 $\mu g/ml$. Stylopin vykazoval mírnou cytotoxickou aktivitu proti rakovině prostaty a prsu s hodnotami IC_{50} 13,9 a 16,6 $\mu g/ml$. (Lee *et al.*, 2005)

V našem pokusu byla inhibice při maximální koncentraci 100%. 100% inhibice přetrvávala až do koncentrace 0,666 – 0,444 mmol/l. Stylopin měl největší inhibiční aktivitu ze všech našich testovaných látek a to IC_{50} 0,202 mmol/l.

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo určit cytotoxicitu následujících alkaloidů (kanadin, skulerin, tetrahydropalmin, stylopin) na modelovém organismu *Tetrahymena thermophila* pomocí metody MTT.

Alkaloidy byly převedeny do roztoků o různých koncentracích, kdy nejvyšší koncentrace byla 1 mmol/l a nejnižší 0,026 mmol/l. Následně byly tyto roztoky aplikovány do mikrotitračních destiček spolu s testovaným organismem *Tetrahymena thermophila* a peptonem.

Průběžně docházelo k měření optické hustoty pomocí readeru ANTHOS 2010 při vlnové délce 492 nm.

Ze získaných hodnot byla spočítána střední inhibiční koncentrace IC_{50} a procentuální inhibice *Tetrahymena thermophila* pro námi testované alkaloidy.

Výsledné hodnoty:

Kanadin	$IC_{50} = 0,375 \pm 0,085$ mmol/l
Skulerin	$IC_{50} = 0,750 \pm 0,043$ mmol/l
Tetrahydropalmin	$IC_{50} = 4,439 \pm 1,909$ mmol/l
Stylopin	$IC_{50} = 0,202 \pm 0,015$ mmol/l

Ze získaných hodnot plyne, že nejvíce toxicky na *Tetrahymena thermophila* působil alkaloid stylopin, nejméně tetrahydropalmin. Pořadí od největší toxicity je následující: stylopin > kanadin > skulerin > tetrahydropalmin.

8. POUŽITÁ LEITERATURA

Albrecht M. A., McCarthy B. C., Comparative Analysis of Goldenseal (*Hydrastis Canadensis* L.) Population Re-Growth Following Human Harvest: Implications for Conservation. *The American Midland Naturalist* **10**, 2006, p. 229-236.

Aniszewski Tadeusz, Alkaloids – secrets of life, alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role, Elsevier, The Netherlands, 2007, p. 315.

Baron S., Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996, kapitola 77-78.

Berdai M. A., Labib S., Chetouani K., *et al.*, Atropa Belladonna intoxication: a case report. *The Pan African Medical Journal* **11**, 2012, p. 72.

Bruneton J., Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants, 2nd edition, Technique & Documentation Lavoisier, France, 1999, p. 1119.

Bun S. S., Laget M., Chea A. *et al.*, Cytotoxic activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*. *Phytother Res.* **23**, 2009, p. 587-590.

Cole E. S., The Tetrahymena Conjugation Junction, In: Madame Curie Bioscience Databas, Landes Bioscience, 2000, p. 564.

Correché E. R, Andujar S. A, Kurdelas R. R. *et al.*, Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: biological effects and structural aspects. *Bioorg Med Chem.* **16**, 2008, p. 3641-3651.

Cushnie T., Cushnie B., Lamb A., Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents* **44**, 2014, p. 377-386.

Dias N., Nicolau A., Carvalho G. S. *et al.*, Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *J. Basic Microbiol.* **39**, 1999, p. 103-108.

- Eisen J. A., Coyne R. S., Wu M. *et al.*, Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. *PLoS Biol.* **4**, 2006, p. 1620-1642.
- Ettefagh K. A., Burns J. T., Junio H. A. *et al.*, Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta Medica* **77**, 2011, p. 835–840.
- Evans D., Trease G. E., Trease and Evans pharmacognosy: Alkaloids, 16th ed, Saunders/Elsevier, 2009, p. 353-415.
- Grycová L., Dostál J., Marek R., Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, **68**, 2007, p. 150-175.
- Guo Z., Man Y., Wang X. *et al.*, Levo-tetrahydropalmatine attenuates oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia in mice. *Scientific Reports* **4**, 2014, p. 1-4.
- Hill L. D., The Biochemistry and Physiology of *Tetrahymena*, Academic Press INC, New York, 1972, p. 230
- Cheng X., Wang D., Jiang L. *et al.*, DNA topoisomerase I inhibitory alkaloids from *Corydalis saxicola*. *Chem Biodivers.* **7**, 2008, p. 1335-1344.
- Jahodář L., Farmakobotanika, nakladatelství Karolinum, Praha, 2009, p. 264.
- Jelínek J, Zicháček V., Biologie pro gymnázia, 4.rozšířené vydání, Olomouc, 2000, p. 85-90.
- Kim E, Graham LE, EE2 Analysis Challenges the Monophyly of Archaeplastida and Chromalveolata. *PLoS ONE* **3**, 2008, p. 2621.
- Lee J., Shon M. Y., Jang D. S. *et al.*, Cytotoxic Isoquinoline Alkaloids from *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**, 2005, p. 198-201.
- Lee T. H, Kim K. H, Lee S. O. *et al.*, Tetrahydroberberine, an isoquinoline alkaloid isolated from corydalis tuber, enhances gastrointestinal motor function. *J Pharmacol Exp Ther.* **338**, 2011, p. 917-924.
- Luck J. M., Sheets G., Thomas O. J., The role of bacteria in the nutrition of protozoa. *The Quarterly Review of Biology* **6**, 1931, p. 46-57.

Lynn, Denis H. "Ciliophora." *eLS*, 2012.

Nawrot R., Wolun-Cholewa M., Bialas W. *et al.*, Cytotoxic Activity of Proteins Isolated from Extracts of *Corydalis Cava* Tubers in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **10**, 2010, p. 78.

NewsRx, Data Mining; INSTM Reports Findings in Data Mining (Data Mining as a Predictive Model for *Chelidonium Majus* Extracts Production). *Information Technology Newsweekly* **17**, 2015, p. 112.

Ouellette M., Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine and International Health* **6**, 2001, p. 874-882.

Paltinean R., Toiu A., Wauters J. N. *et al.*, Identification and determination of alkaloids in *Fumaria* species from Romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **8**, 2013, p. 817-824.

Qiu S, Sun H, Zhang A *et al.*, Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin J Nat Med* **12**, 2014, p. 401-406.

Ratsch Christian, The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its Applications, Rochester: Park Street Press, 1998, p. 320-347.

Sedlák E., Zoologie bezobratlých, 2.přepřac.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2003, p. 24-26.

Shibumon G., Benny P. J., Activity of the crude extract of *Flacourtia inermis* fruit by microscopic count method. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* **1**, 2010, p. 385-388.

Singh G., Kumar P., Evaluation of antimicrobial activity of alkaloids of *Terminalia chebula* Retz. against some multidrug-resistant microorganism. *Int J Green Pharm* **6**, 2012, p. 57-62.

Toman J., Hísek K., Přírodou krok za krokem-rostliny, 3.přepřac.vyd., Praha: Albatros nakladatelství, a.s., 2001, p. 60.

Wink M., Mode of action and toxicology of plant toxins and poisonous plants. *Mitt. Julius Kühn-Inst.* **421**, 2009, p. 93-112.

Yang Ch., Chen Min; Zeng Lingjiang *et al.*, Improvement of Tropane Alkaloids Production in Hairy Root Cultures of *Atropa Belladonna* by Overexpressing Pmt and h6h Genes. *Plant Omics* **4**, 2011, p. 29-33.

Yuea K., Maa B., Rua Q. *et al.*, The dopamine receptor antagonist levotetrahydropalmatine attenuates heroin self-administration and heroin-induced reinstatement in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **102**, 2012, p. 1-5.

Zentrich J. A., Byliny v prevenci, nakladatelství FONTÁNA v Olomouci, 1991, s. 131.

<http://science.howstuffworks.com/alkaloid-info.htm> (staženo 3.1.2015)

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/480488/protozoan/296872/Mechanisms-of-asexual-reproduction> (staženo 5.1.2015)

<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=3336> (staženo 5.1.2015)

<http://web.archive.org/web/20080519091815/http://www.microbeworld.org/microbes/protoista/protozoa.aspx> (staženo 3.12.2014)

<http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php> (staženo 24.2.2015)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440583#section=Top> –a (staženo 2.3.2015)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22955#section=Top> –b (staženo 2.3.2015)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/34458#section=Top> –c (staženo 2.3.2015)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72301> -d (staženo 2.3.2015)

<http://www.herbwisdom.com/herb-goldenseal.html> (staženo 5.3.2015)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Prvoci#Stavba_t.C4.9Bla (staženo 8.3.2015)

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/15672/alkaloid> (staženo 8.3.2015)

http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v08a_alk.pdf (staženo 10.4.2015)

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Radka Kvapilová

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Antiprotozoální aktivita alkaloidů II.

Vývoj nových antiprotozoálních látek k léčbě infekcí je stále velmi důležitý. Zdrojem účinných léčiv mohou být přírodní látky. Cílem této práce bylo zhodnotit antiprotozoální aktivitu následujících alkaloidů – kanadinu, skulerinu, tetrahydropalmatinu a stylopinu. Pokus byl prováděn na typickém modelovém organismu *Tetrahymena thermophila*. Byla stanovena procentuální inhibice organismu pomocí testu MTT. Následně byla vypočítána střední inhibiční koncentrace IC₅₀ testovaných látek. Z našich alkaloidů měl největší antiprotozoální aktivitu stylopin. Aktivita klesala v pořadí stylopin > kanadin > skulerin > tetrahydropalmatin.

Klíčová slova: *Tetrahymena thermophila*, antiprotozoální aktivita, kanadin, skulerin, tetrahydropalmatin, stylopin

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Author: Radka Kvapilová

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

Antiprotozoal activity of alkaloids II.

The development of new antiprotozoal agents for the treatment of infections is very important. Natural substances can be the source of effective drugs. The aim of this study was to evaluate the antiprotozoal activity of these alkaloids - canadine, scoulerine, tetrahydropalmatine and stylophine. The experiment was conducted on typical model organism *Tetrahymena thermophila*. Percentage inhibition of the organism was determined using the MTT assay. Subsequently median inhibitory concentration IC₅₀ of the test substances was calculated. From our alkaloids stylophine had the greatest antiprotozoal activity. Antiprotozoal activity decreased in the following order stylophine > canadine > scoulerine > tetrahydropalmatine.

Key words: *Tetrahymena thermophila*, antiprotozoal activity, canadine, scoulerine, tetrahydropalmatine, stylophine